



## Scientia Agropecuaria

Website: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>Facultad de Ciencias  
AgropecuariasUniversidad Nacional de  
Trujillo

# Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sachá inchi (*Plukenetia volubilis*)

Flavonoids extracted from orange peelings tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) and their application as a natural antioxidant in sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) vegetable oil

**Matilde Tenorio Domínguez**

Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos. Escuela Académico Profesional de Ingeniería de Alimentos. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Peru.

Received April 26, 2016. Accepted November 07, 2016.

### Resumen

La investigación tuvo como objetivo obtener extractos de flavonoides de la cáscara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y aplicarlos como, antioxidante natural en el aceite vegetal Sachá inchi (*Plukenetia volubilis*). La información se obtuvo de las pruebas experimentales, que se realizó en siete etapas: caracterización física y química de la naranja tangelo y del aceite vegetal sachá inchi, obtención de los extractos de flavonoides por Soxhlet, detección de los flavonoides de cada extracto por cromatografía de capa fina y cromatografía de papel, identificación y cuantificación de los flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinación de la capacidad antioxidante de cada extracto de flavonoide y finalmente se evaluó la actividad antioxidante en el aceite sachá inchi, del extracto que tuvo la mayor capacidad antioxidante, para lo cual se utilizó un diseño multifactorial con dos factores: extractos de flavonoides y concentración con tres niveles: 0,05%; 0,1% y 0,15% y 16 bloques que son los tiempos. Los resultados mostraron que en el extracto acuoso se encontró la mayor cantidad de flavonoides: 100,3724 mg/g, siendo la naringina con 81,1727 mg/g el flavonoide que se encontró en mayor proporción. A la concentración del 0,1% el extracto de flavonoide presentó el menor índice de peróxido a las 384 horas. Se concluye que los flavonoides presentes en la cascara de naranja tangelo pueden ser utilizados como extractos crudos sin necesidad de purificaciones parciales o totales, para conseguir aumentar la vida útil del aceite sachá inchi.

**Palabras clave:** Naranja tangelo; sachá inchi; flavonoide; capacidad antioxidante; actividad antioxidante.

### Abstract

The purpose of this research was to obtain extracts of flavonoids from orange tangelo peelings (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) and apply them as natural antioxidant to the vegetable oil Sachá inchi (*Plukenetia volubilis*). The information was obtained from experimental tests which were made in seven steps: physical and chemical characterization of the orange tangelo and the sachá inchi oil; extraction of flavonoids by the Soxhlet extractor; detection of flavonoids in each extract through fine layer chromatography and paper chromatography; identification and quantification of flavonoids by high resolution chromatography liquid (HPLC); determination of the antioxidant capacity of each extract of flavonoid, and finally evaluation of the antioxidant activity in oil sachá inchi, of the extract with the higher level of antioxidant capacity using a multifactorial design with two factors: extracts of flavonoids and concentration at three levels: 0.05%; 0.1% and 0.15%, and 16 blocks which are the times. The results showed that the liquid extract had the greatest quantity of flavonoids: 100.3724 mg/g, being naringine with 81.1727 mg/g, the flavonoid found in greatest proportion. At a concentration of 0.1%, the extract of flavonoid showed the lowest index of peroxide at 384 hours. It is concluded that the flavonoids present in the orange tangelo peeling can be used as raw extracts, without needing partial or total purification, to increase the sachá inchi oil life.

**Keywords:** Orange tangelo; sachá inchi; flavonoid; antioxidant capacity; antioxidant activity.

\* Corresponding author

E-mail: [tenoriomd@ yahoo.es](mailto:tenoriomd@ yahoo.es) (M. Tenorio-Dominguez).

© 2016 All rights reserved.

DOI: [10.17268/sci.agropecu.2016.04.07](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.04.07)

## 1. Introducción

En el Perú se cultivan muchas especies y variedades de cítricos, desde que fueron traídos por los españoles. La naranja tangelo se cultiva en el departamento de Ica, siendo la producción de 19988 miles de toneladas para el periodo enero - abril del año 2014 (Ministerio de Agricultura y Riego, 2014).

Alrededor de un tercio de frutas cítricas van a producir jugo fresco o bebidas a base de cítricos. El rendimiento de jugo de frutas cítricas representa la mitad del peso de la fruta, y por lo tanto una gran cantidad de desecho de pulpa y cáscara es producido cada año a nivel mundial (Li *et al.*, 2006). En la agricultura y producción tradicionales, estos residuos (cáscaras) tienen valor bajo o nulo y aún pueden constituir un problema ambiental debido a su acumulación cerca de las zonas industriales. Los residuos generados han sido tradicionalmente transformados en salvado peletizado para alimento de animales (Rezzadori *et al.*, 2012).

Sin embargo, se ha encontrado que las cáscaras son la principal fuente de polifenoles en frutas cítricas (Padilla-Camberos *et al.*, 2014). Residuos de cáscara de naranjas dulces y amargas, limones y mandarinas han probado ser fuente importante de ácidos fenólicos y flavonoides, principalmente polimetoxiflavonas (PMFs), flavanonas, y flavanonas glicosiladas (Wang *et al.*, 2014; Xi *et al.*, 2014).

De otro lado, algunos estudios han argumentado que los flavonoides agliconas exhiben una mayor capacidad antioxidante y eficiencia para captar radicales que sus respectivos glucósidos (Cavia-Saiz *et al.*, 2010).

Para sustituir aditivos sintéticos tales como hidroxianisol butilado (BHA) y hidroxitolueno butilado (BHT), debido a sus efectos cancerígenos (Ak y Gülcin, 2008) y efectos tóxicos (Moure *et al.*, 2001), los compuestos naturales han recibido mucho interés en los últimos años. Entre estos compuestos, el extracto fenólico de cáscara de naranja parecía ser una interesante

alternativa. En efecto, los cítricos deben su actividad biológica en gran medida a la presencia de fenoles y flavonoides, metabolitos secundarios de las plantas que se oxidan fácilmente, por lo que constituyen potentes antioxidantes (Li *et al.*, 2009). El paso limitante para el uso de estos compuestos es su extracción de la materia prima.

Dadas las propiedades antes mencionadas de los flavonoides presentes en los cítricos, en esta investigación se plantea el acondicionamiento del aceite sachá inchi (el cual presenta altas concentraciones de ácido linoléico y linolénico, elevado índice de yodo y por ende susceptibles a las reacciones de oxidación) con extractos de flavonoides provenientes de la cáscara de tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) como sustituto de agentes antioxidantes de origen natural.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Etapas preliminares de las materias primas

Se recolectó un lote de 30kg de naranjas tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*), variedad, Minneola del fundo: Los Ángeles, ubicado en la Panamericana Sur 245,5 km, Pisco. Las muestras se trasladaron en un saco de 30kg hasta las instalaciones del Centro de Control Analítico CENTROFARMA de la Universidad Nacional San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Adicionalmente se compró 10 litros de aceite sachá inchi (*Plukenetia volubilis*), extra virgen prensado en frío, a la empresa Peruvian Functional Foods SAC, se trasladó en envases de vidrio de color verde herméticamente cerrados (para protegerlo de la luz) hasta el laboratorio.

### 2.2 Análisis físico-químico de las materias primas

Del lote original se tomó una muestra de 30 frutas para la determinación de humedad a las cáscaras según la metodología de la AOAC (2005). Al jugo extraído se evaluaron sólidos solubles, expresados como °Brix, mediante refractómetro marca

Baush & Lamb modelo Abbe 3L (AOAC, 2005), acidez iónica mediante un potenciómetro marca Orión, modelo SA 720 y acidez titulable según la metodología de la AOAC (2005). A una muestra de 250ml de aceite *sacha inchi* extra virgen y libre de antioxidantes sintéticos, se le determinó índice de peróxido, índice de yodo, índice de saponificación e índice de acidez, según la metodología de la AOAC (2005).

## 2.3 Metodología experimental

### 2.3.1 Obtención de harina de cascara de naranja tangelo

Las naranjas seleccionadas se sumergieron en agua corriente y se frotaron manualmente con la finalidad de eliminar residuos de polvo y materia orgánica que pudiese estar adherida a las cáscaras, luego las cáscaras fueron desprovistas del albedo (parte blanca) y cortadas en trozos de 4 cm aproximadamente, usando para ello cuchillo de acero inoxidable. Posteriormente sometidas a secado en una estufa al aire, marca Baby Mammoth. Watts 600, Volts 115, Hp 1/3 a una temperatura de 45°C hasta alcanzar una humedad comprendida entre 7% y 10%. Luego se efectuó una molienda utilizando un procesador de alimentos marca Moulinex, con el propósito de obtener la granulometría (Tamiz marca Sardo apertura 0,25 mm) deseada para facilitar así el proceso de extracción (Moreno-Álvarez, 2000). La harina de cáscaras de naranja fue empacada en papel aluminio luego en bolsas de polietileno selladas herméticamente y posteriormente almacenadas a -10 °C antes de usar.

### 2.3.2 Obtención de los extractos de flavonoides

El método descrito por Lock (1994) y Wan *et al.* (2015) con algunas modificaciones se utilizó para la extracción de flavonoides. Se pesaron tres cantidades diferentes de harina de cascara de naranja: 2,5 g, 5 g y 7,5 g por triplicado, luego se realizó una extracción secuencial, para lo cual a las muestras secas y molidas se eliminó clorofila y lípidos con éter de petróleo, y el

marco se extrajo con metanol al 70%, para garantizar la extracción de los más polares, el extracto obtenido se evaporó con calentamiento no superior a 50 °C y se realizó extracciones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo. De esta manera los flavonoides apolares quedaron en la fase etérea, los medianamente polares en la fase acetato de etilo y los más polares en la fase acuosa resultante.

Como se trabajó con tres diferentes pesos de harina de cáscara de naranja (2,5 g; 5 g y 7,5 g) para obtener los extractos, se identificaron de la siguiente manera:

M1, M2 y M3 = Extracto metanólico.

M4, M5 y M6 = Extracto éter etílico.

M7, M8 y M9 = Extracto acetato de etilo.

M10, M11 y M12 = Extracto acuoso.

Luego a cada uno de los extractos obtenidos se realizó un screening o tamizaje fitoquímico y un reconocimiento de flavonoides mediante la reacción de color: Ensayo de Shinoda.

### 2.3.3 Detección de flavonoides de cada extracto utilizando técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas utilizadas para la detección de flavonoides fueron: cromatografía de capa fina y cromatografía de papel.

#### *Técnica de cromatografía de capa fina*

El método descrito por Lock (1994) y Barrón-Yáñez *et al.* (2011) con algunas modificaciones se utilizó para cromatografía de capa fina. La técnica elegida fue: Cromatografía en capa fina unidimensional ascendente, en Sílica (gel 60 F<sub>254</sub>: 20 x 20 cm (Merck), y como eluyente se utilizó una mezcla de butanol: ácido acético: agua destilada (BAW) en una proporción de 40:10:50 % (v/v) fase superior. El tiempo de desarrollo del cromatograma fue de seis horas a 18-20 °C. Los estándares utilizados fueron quercetina, naringina, rutina, hesperidina, neohesperidina, luteolina, kaempferol, que fueron comprados de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri USA), se prepararon como soluciones de 0,5% en metanol y 10 µl fue usado en la placa cromatográfica. Los extractos de flavo-

noides: M3, M6, M9, M12 / 10 µl son utilizados por tener estos extractos mayor cantidad de harina de cascara de naranja (7,5 g). Las placas se visualizaron con luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm y se revelaron por aspersión de los reactivos: vapores de amoníaco, FeCl<sub>3</sub> al 5% en metanol, H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> al 50% en metanol. La codificación: orden de adición de estándares y muestras en la placa cromatográfica fue 1 = quercetina, 2 = naringina, 3 = rutina, 4 = hesperidina, 5 = neohesperidina, 6 = luteolina, 7 = kaempferol, 8 = M3, 9 = M6, 10 = M9, 11 = M12.

### **Técnica de cromatografía de papel**

El método descrito por Lock (1994) y Cartaya y Reynaldo (2001) con algunas modificaciones se utilizó para cromatografía de papel. Se realizó cromatografía descendente utilizando papel Watman N° 1 de 46 cm x 11 cm, el número de sembradas de estándares y extractos fue de 40 con un capilar, visualizándose en manchas de 6 mm a 10 mm y con separación de no menos de 3 cm y como eluyente se utilizó una mezcla de butanol: ácido acético: agua destilada (BAW) en una proporción de 40:10:50 % (v/v) fase superior. El tiempo de desarrollo del cromatograma fue de 12 h a 18-20 °C y el secado de 3 h. Los estándares utilizados fueron quercetina, naringina, rutina, hesperidina, neohesperidina, luteolina, kaempferol. Los extractos de flavonoides utilizados fueron: M3, M6, M9, M12. El papel fue visualizado con luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm y se revelaron con vapores de amoníaco.

### **2.3.4 Análisis de flavonoides por HPLC**

La identificación y cuantificación de los flavonoides presentes en los distintos extractos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por la comparación con los T<sub>R</sub> (tiempo de retención) de los estándares o patrones de flavonoides puros y de los espectros correspondientes (Castro-Vásquez, 2015). A cada extracto que fue obtenido inicialmente por extracción líquido líquido se tuvo que realizar una extracción en fase

sólida para poder extraer el analito (flavonoide) lo más purificado para así poder ser analizado por HPLC, utilizando un equipo de extracción, con bomba, marca Sepack. Luego los extractos de flavonoides y estándares fueron analizados por HPLC (Agilent Serie 1200) en fase reversa, con una bomba binaria SL Serie 1200, inyector automático de alto rendimiento LS Plus Serie 1200, provisto de un detector de longitud de onda variable SL Plus Serie 1200. Se utilizó una columna Terra RP-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) a 40 °C. La detección se realizó de 254nm-300 nm. Como solventes de la fase móvil se empleó, solvente A: 0,1 % ácido fosfórico-acetonitrilo y solvente B: 0,1% ácido fosfórico-Agua. El gradiente de solventes fue como sigue: 0 min 5% A, 3 min 40% A, 8 min 40% A, 20 min 5% de A, a una velocidad de flujo de 1,0 ml / min, y un volumen de inyección de 40 µl de los estándares: quercetina, naringina, rutina, hesperidina, neohesperidina, luteolina, kaempferol y los extractos de flavonoides: M3, M6, M9, M12.

### **2.3.5 Capacidad Antioxidante**

El ensayo DPPH se realizó de acuerdo con el método propuesto por (Alañón *et al.*, 2011), donde se usó el radical 1,1-difenil-2-picrilhydrazyl como un radical estable. Se procedió a determinar la capacidad antioxidante, para los diferentes extractos de flavonoides, a las concentraciones de 25 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml, utilizando el radical DPPH de Sigma-Aldrich en solución metanólica, leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 517 nm, marca Helios Zeta UV-Vis. Los extractos se concentraron hasta la total eliminación de los solventes, utilizando un rota vapor Büchi R-205. Se determinó la capacidad antioxidante (% de captación de radical libre), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad antioxidante} = [1 - (A2 - A3)/A1] \times 100.$$

Dónde: A1 = absorbancia del patrón de referencia (Abs. DPPH). A2 = absorbancia de la muestra. A3 = absorbancia del blanco de la muestra.

### 2.3.6 Actividad Antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante del extracto que tuvo la mayor capacidad antioxidante, con la determinación del índice de peróxido al aceite vegetal sachá inchi (*Plukenetia volubilis*), a través del tiempo. La actividad antioxidante se evaluó mediante el método Schaal (Mehlenbacher, 1979), el cual se basa en colocar muestras de aceite bajo condiciones intensivas de temperatura constante en una estufa. Se pesaron muestras de 250 g de aceite sachá inchi en vasos de precipitado de 500 ml a los cuales se les adicionaron cantidades independientes de los extractos de flavonoides que tuvieron la mayor capacidad antioxidante resuspendidos en el aceite sachá inchi, empleando concentraciones de 0,05 %; 0,1% y 0,15% y una muestra control a la cual no le fue adicionado extracto de flavonoide. Todas las muestras fueron sometidas a la prueba de la estabilidad a la estufa (Marca Baby Mammoth. Watts 600, Volts 115, Hp 1/3) a una temperatura constante de  $60 \pm 1$  °C. Seguidamente a cada una de las muestras acondicionadas con extractos de flavonoides y al control se les determinó el índice de peróxido por triplicado cada 24 h, al momento de comenzar el ensayo de la estufa, hasta que las muestras o el control alcanzaron un valor de peróxido de 100 meq O<sub>2</sub>/kg (AOM, Active Oxygen Method).

### 2.4 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre los extractos de flavonoides, concentraciones y tiempos se aplicó la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) ( $p < 0,05$ ), para lo cual se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0. Este programa además nos permitió dar un gráfico de superficie de respuesta estimada de los datos experimentales, con lo que se pudo inferir cuál es la región donde se encuentra el índice de peróxido más bajo y a que concentración corresponde. Así mismo este programa, nos permitió hacer un análisis de comparaciones múltiples de las pendientes de los

modelos matemáticos de las curvas exponenciales obtenidas para determinar las diferencias significativas entre las pendientes de diferentes concentraciones (0,05%; 0,1% y 0,15%) y la muestra-control.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Análisis físico-químico de las materias primas

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica del jugo, cáscaras y harina de la naranja tangelo. El índice de madurez obtenido mediante la relación °Brix/índice de acidez fue de 20,31 que es ligeramente menor al de 21,66 reportado en pomelo (*Citrus paradisi Macf*) (Moreno-Álvarez *et al.*, 2007). Un valor tan alto de índice de madurez representa un grado óptimo de maduración, así como también una adecuada relación del contenido de pigmentos fenólicos presentes en las cáscaras. Las muestras fueron seleccionadas sin rastro aparente de clorofila ya que estos metabolitos son característicos de los frutos inmaduros (Badúí-Dergal, 2006). Se presentan los valores obtenidos de la humedad de la cascara y harina de cascara de la naranja tangelo. El valor de humedad inicial de la cáscara de 66,50% y de la harina 7,05% es similar al obtenido por Moreno-Álvarez *et al.* (2004).

**Tabla 1**

Análisis físico químico de jugo, cascara y harina de cascara de naranja tangelo

Muestra	°Brix	pH	Acidez*	Índice de Madurez**	Humedad (%)
Jugo	13,2 ± 0,1	3,41 ± 0,01	0,65 ± 0,01	20,31 ± 0,016	
Cáscaras					66,50 ± 0,016
Harina					7,05 ± 0,016

\* Expresado como ácido cítrico (g)/100 mL.

\*\* Relación °Brix/Acidez.

En la Tabla 2 se presentan los valores obtenidos del análisis físico-químico del aceite sachá inchi. Los valores obtenidos están comprendidos dentro de las especificaciones señalados por el Codex Alimentarius (1981) para aceites prensados



en frío. En cuanto al valor del índice de yodo encontrado 168,7770 (g de Y/100 g aceite) es ligeramente superior al obtenido por (García *et al.*, 2013) que fue de 149,43 (g de Y/100 g aceite). Este valor alto del índice de yodo, se explica por el alto contenido de ácidos grasos insaturados que contiene el aceite sachá inchi (García *et al.*, 2013). En cuanto a los valores de acidez y peróxido, éstos reflejan una buena calidad del aceite y un bajo grado de rancidez o deterioro.

**Tabla 2**

Análisis físico-químico del aceite de sachá inchi

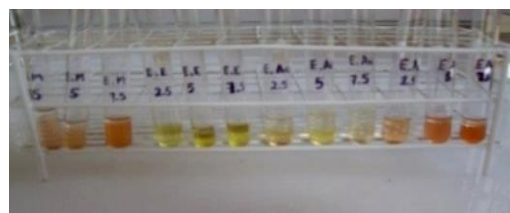
Índice de peróxido (meq O <sub>2</sub> /kg ac)	Índice de yodo (g de Y/100 g ac)	Índice de saponificación (mg KOH/g ac)	Acidez (mg KOH/g ac)
2,5692 ± 0,21	168,7770 ± 1,25	194,2976 ± 1,31	0,3349 ± 0,01

### 3.2 Obtención de flavonoides de los extractos

Se obtuvieron 12 extractos a partir de la harina de cáscara de naranja: extracto metanólico (70:30): M1, M2, M3, extracto éter etílico: M4, M5, M6, extracto acetato de etilo: M7, M8, M9 y extracto acuoso: M10, M11 y M12. Resultados de estudios anteriores demuestran que el rendimiento de la extracción de fenoles y el contenido de flavonoides es mayor, dependiendo la polaridad del disolvente (Turkmen *et al.*, 2006; Lapornik *et al.*, 2005), es por eso que se utilizó en esta investigación metanol y agua como disolventes polares, acetato de etilo como medianamente polar y éter etílico como disolvente no polar. Al ser evaluados individualmente los 12 extractos obtenidos por ensayos cualitativos de reconocimiento de flavonoides (ensayo de Shinoda) se confirmó la presencia de flavonoides en cada uno de los extractos, siendo muy positiva y positiva la presencia de flavonoides en el extracto metanólico y acuoso (Figura 1).

Se han reportado diferentes técnicas para la extracción de la materia prima, tales como extracción por solvente, extracción por agua caliente, extracción alcalina, extracción asistida por enzima, extracción asis-

tida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por presión hidrostática alta y por fluido supercrítico (M'hiri *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Fotografía del ensayo de shinoda con los 12 extractos de flavonoides.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo (Martínez, 2005).

#### 3.2.1 Sreenig fitoquímico de los extractos

Se realizaron los siguientes ensayos: ensayo de dragendorff, ensayo de bornträger, ensayo de fehling, ensayo de espuma, ensayo de cloruro férrico, ensayo de carotenos, ensayo de gelatina. El sreening o tamizaje fitoquímico a los extractos ha puesto de manifiesto que los 12 extractos de cáscara de naranja (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) carecen de algunos principios activos como son los alcaloides, saponinas y gelatinas. Además, hay mayor presencia de quinonas, azúcares reductores, compuestos fenólicos y carotenos en los extractos metanólicos y acuosos.

#### 3.3. Detección de flavonoides de cada extracto utilizando técnicas cromatográficas

La detección de los flavonoides en ambas cromatografías, de capa fina y de papel puede hacerse por el color que desarrollan en el Vis o en el UV, apareciendo como

manchas fluorescentes azules, rosadas, naranjas, púrpuras y otras, las cuales se intensifican o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoníaco (Lock, 1994).

### 3.3.1 Técnica de cromatografía de capa fina

Markham (1982) reportó la relación que existe entre los colores y la posible estructura del flavonoide. En la fotografía de la Figura 2 no se observó la elusión de los estándares naringina con el número 2, neohesperidina con el número 5 y kaempferol con el número 7, por lo cual se utilizó como reveladores: luz UV a 366 nm y vapores de amoníaco, lo cual se aprecia en la Figura 3.



**Figura 2.** Fotografía. Análisis cualitativo de flavonoides por CCF unidimensional ascendente. En UV a 366 nm.



**Figura 3.** Fotografía. Análisis cualitativo de flavonoides por CCF unidimensional ascendente. con reveladores UV a 366 nm y vapores de amoníaco.

En Figura 3 se observó la elusión de todos los estándares, además la presencia de bandas coloreadas en cada muestra, lo cual nos confirmó la presencia de flavonoides (Markham, 1982). Así mismo en esta placa se observó claramente la elusión de los 7 estándares con la que se realizó el cálculo del valor Rf para cada estándar. Así tenemos en la Tabla 3 el valor Rf de los estándares.

Es de destacar la utilidad de la cromatografía en capa fina como técnica de análisis previo de los extractos, ya que nos da una idea, tanto de su composición (naturaleza de los principios activos): flavonas, flavonoles y flavanonas, como de la riqueza e identidad (por comparación con los Rf de patrones químicamente puros) de los compuestos flavónicos presentes.

**Tabla 3**

Valor Rf de los estándares

Estándar	Rf
Quercetina Q.P	0,92
Naringina Q.P	0,64
Rutina Q.P	0,55
Hesperidina Q.P.	0,62
Neohesperidina Q.P	0,62
Luteolina Q.P	0,95
Kaempferol Q.P	0,90

Así, según esta placa cromatográfica (Figura 3), de acuerdo a los valores de Rf calculados para cada uno de los estándares, tenemos para el caso de cada una de las muestras:

8 = M3: extracto metanólico, a partir de 7,5 g de harina de cáscara de naranja. Presentó 6 bandas. La correspondencia de los valores de Rf de los estándares con las bandas 3, 4 y 5, confirmó la presencia de naringina, hesperidina, neohesperidina y rutina.

9 = M6: extracto éter etílico, a partir de 7,5 g de harina de cáscara de naranja. Presentó 6 bandas. La correspondencia de los valores de Rf de los estándares con las bandas 1, 2, 3, 5 y 6 confirmó la presencia de luteolina, quercetina kaempferol naringina hesperidina y neohesperidina.

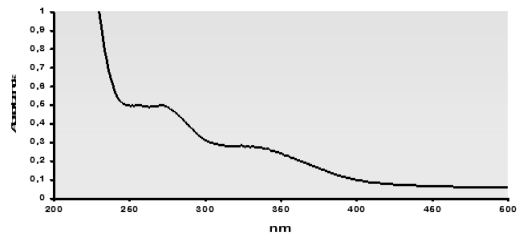
10 = M9: extracto acetato de etilo, a partir de 7,5 g de harina de cáscara de naranja. Presentó 8 bandas. La correspondencia de los valores de Rf de los estándares con las bandas 1, 2, 3, 5 y 6 confirmó la presencia de, luteolina, quercetina, kaempferol, naringina, hesperidina neohesperidina.

11 = M12: extracto acuoso a partir de 7,5 g de harina de cáscara de naranja. Presentó 9 bandas. La correspondencia de los valores de Rf de los estándares con las bandas 2, 3 y 4 confirmó la presencia de naringina, hesperidina, neohesperidina y rutina.

### 3.3.2 Técnica de cromatografía de papel

Cabe resaltar la utilidad de la cromatografía de papel como técnica de apoyo en el análisis de los extractos vegetales, proporcionando una aproximación bastante exacta a su composición real, así se confirmó la presencia de flavonas, flavonoles, flavanonas en cada una de las bandas en los extractos metanólico (70:30), éter etílico, acetato de etilo y acuoso en cada uno de los espectros de absorción UV- Vis. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos 250-280 nm (Banda II, BII) y 300-385 nm (Banda I, BI).

En la Figura 4 se aprecia el espectro de absorción UV-Vis de la banda 2 del extracto acuoso, obtenidos en la cromatografía de papel descendente donde hubo mayor cambio en la intensidad del color con el revelador vapor de amoníaco del extracto acuoso, lo cual sirvió para analizar el tipo de flavonoide como el modelo de oxigenación. Así tenemos en el espectro de absorción UV- Vis de la banda 2, la Banda II: 250-280 nm ( $\lambda_{\text{máx.}}$ : 257 sh, 274) y la Banda I: 315-385 nm ( $\lambda_{\text{máx.}}$ : 340 nm) por lo que, según el modelo de espectro de absorción presentado por (Markham, 1982), se tiene la presencia en el extracto acuoso de flavonas y flavonoles (3-OH substituido) y flavonoles (3-OH libre). En flavonas y flavonoles, la presencia de o-hidroxilo en 3' y 4', generalmente se evidencia por un segundo pico (sh) (algunas veces un hombro) en la Banda II.



**Figura 4.** Espectro de absorción UV-Vis de la banda 2 del extracto acuoso.

### 3.4 Análisis de flavonoides por HPLC

#### 3.4.1 Identificación de flavonoides

En la Tabla 4 se presentan los resultados de los tiempos de retención y la absorbancia a la que fueron detectados los estándares y flavonoides en cada uno de los extractos.

La separación, identificación y cuantificación por HPLC se realizó utilizando columnas llamadas de fase reversa RP, ya que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, de esta forma los solutos más polares poseen tiempos de retención más cortos que los solutos menos polares, así en la separación de mezclas complejas de flavonoides los glicósidos eludirán primero (hesperidina, neohesperidina, naringina, rutina), seguido por las agliconas (kaempferol, quercetina y luteolina) generalmente en orden de polaridad decreciente (Lock, 1994), por lo que se utilizó: columna Terra RP-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) Así se confirmó finalmente la presencia de Naringina, Hesperidina, Neohesperidina, (flavanonas), Quercetina, Rutina, Kaempferol (flavonoles) y luteolina (flavona).

**Tabla 4**

Tiempos de retención (TR) de los estándares y flavonoides: naringina, hesperidina, neohesperidina, rutina, quercetina, kaempferol, luteolina en cada uno de los extractos

Flavonoides	Detección (nm)	TR				
		Estándar Flavonoide	Extracto Metanólico	Extracto Éter Etfílico	Extracto Acetato de Etilo	Extracto Acuoso
Naringina	280	4,425	4,376	—	4,370	4,381
Hesperidina	300	4,371	4,377	—	4,371	4,384
Neohesperidina	300	4,377	4,377	—	4,371	4,384
Rutina	350	6,526	6,525	6,523	6,522	6,522
Quercetina	350	5,583	5,527	5,529	5,524	5,529
Kaempferol	340	5,494	5,528	5,532	5,525	5,529
Luteolina	254	6,328	6,242	6,247	6,242	6,243



### 3.4.2 Cuantificación de flavonoides

En la Tabla 5 se presentan el contenido total de flavonoides en cada uno de los extractos analizados por HPLC. De la cuantificación de flavonoides podemos decir que el flavonoide: naringina se encuentra en mayor proporción en la cáscara de naranja tangelo, ya que en el extracto acuoso se encontró 81,1727 mg/g y en el extracto metanólico se encontró 49,9399 mg/g.

Después de la naringina se encontró en segundo lugar el flavonoide hesperidina, ya que en el extracto acuoso se cuantificó 13,5955 mg/g y en el extracto metanólico 10,7109 mg/g. El flavonoide quercetina se encontró en menor cantidad en cada uno de los extractos.

Los niveles de naringina cuantificados en los extractos acuoso y metanólico: 81,1727 mg/g y 49,9399 mg/g respectivamente en la cáscara de naranja tangelo (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*) (Tabla 5), fueron superiores a los niveles publicados de naringina en la cascara de ocho variedades de frutas cítricas (*Citrus reticulata* Blanco, *C. tankan* Hayata, *C. reticulata x C. sinensis*, *C. grandis* Osbeck, *C. grandis* Osbeck CV, *C. microcarpa*, *C. sinensis* (L) Osbeck, *C. limón* (L) Bur), que fueron de 0,21 mg/g a 29,8 mg/g (Yuan-Chuen *et al.*, 2008). Sin embargo, el contenido de naringina de esta investigación: 14,6049 mg/g en el extracto acetato de etilo es inferior a las variedades cítricas *C. grandis* Osbeck y *C. grandis* Osbeck CV, por

presentar valores de 23,9 mg/g y 29,8 mg/g respectivamente.

El nivel cuantificado de hesperidina en naranjas tangelo (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*) es inferior a lo publicado en cascara de frutas cítricas: *Citrus reticulata*, mandarina Ponkan y mandarina australiana: 89,68 mg/g; 154,41 mg/g y 167,98 mg/g respectivamente (Wan *et al.*, 2015).

Los niveles de naringina hesperidina y neohesperidina de los extractos acuosos y metanólicos de la cáscara de naranja tangelo (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*) (Tabla 5), son superiores a los niveles publicados de naringina hesperidina y neohesperidina en las variedades de toronja rosada y blanca secadas en estufa a 45 °C, que varían entre 45,92-59,41 mg/g DW, 0,21-0,51 mg/g DW y 0,30-0,79 mg/g DW respectivamente (Castro-Vázquez *et al.*, 2016). Para el caso del flavonoide rutín una extracción por CO<sub>2</sub> supercrítico a una temperatura de 80 °C y una presión de 10 MPa en cascara de naranja es óptima, nos da 9,06 ± 0,12 g rutín/kg (M'hiri *et al.*, 2015), valor muy superior a lo cuantificado en esta investigación por extracción por solventes en los extractos metanólico, acetato de etilo y acuoso.

El nivel de quercitina cuantificado en esta investigación es inferior al nivel publicado de quercitina en muestras de cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) en extracto metanólico que fue de 14,32 mg/g (Pérez-Nájera *et al.*, 2013).

**Tabla 5**

Contenido total de flavonoides en cada uno de los extractos

Flavonoides (mg/g)	Extracto			
	Metanólico (mg/ g)	Éter Etilico (mg/ g)	Acetato de Etilo (mg/ g)	Acuoso (mg/ g)
Naringina	49,9399±0,32	–	14,6049±0,15	81,1727±0,54
Hesperidina	10,7190±0,11	–	2,4584±0,03	13,5955±0,21
Neohesperidina	2,4540±0,04	–	0,7477±0,003	4,9013±0,06
Rutina	0,8372±0,004	6,1963±0,08	0,0735±0,002	0,5576±0,02
Quercetina	0,0517±0,001	0,0775±0,002	0,0505±0,001	0,0465±0,001
Kaempferol	0,1624±0,002	0,3110±0,004	0,0816±0,002	0,0697±0,002
Luteolina	0,3067±0,003	2,9766±0,03	0,1637±0,003	0,0291±0,001
Total flavonoides	64,4709	9,5614	18,1803	100,3724

Los datos presentados con la desviación estándar (m=3).

Sin embargo, las flavanonas glucósido más abundantes en cáscara de cítricos son naringina, hesperidina y neohesperidina que presumiblemente exhiben beneficios para la salud tales como supresión de carcinogénesis y deterioro en la proliferación de células cancerígenas (Gates *et al.*, 2009; Meiyanto *et al.*, 2012).

### 3.5 Capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante por el método del DPPH, medida por el porcentaje de captación de radicales libres, para los diferentes extractos de flavonoides, a las concentraciones de 25 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml, utilizado al ácido ascórbico como estándar o patrón de comparación.

La mayor capacidad antioxidante se obtuvo en los extractos acuosos M10, M11 y M12, con una captación de radicales libres de: 98,01%; 98,43% y 98,45% para 100 ug/ml (Tabla 6).

**Tabla 6**

Capacidad antioxidante por el método del DPPH a la concentración de 100 ug/ml

Extractos de flavonoides	Porcentaje de captación de radical libre (R.L.)
M1	92,17
M2	97,56
M3	97,74
M4	92,17
M5	93,91
M6	94,96
M7	96,52
M8	94,01
M9	94,78
M10	98,01
M11	98,43
M12	98,45
Ácido Ascórbico	98,52

Alejandro-Espinosa *et al.* (2013) mencionan que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes que podrían ser vitamina C, carotenoides, entre otros. Lo cual queda confirmado en esta investigación, ya que se utilizó una fruta cítrica, además el screening o tamizaje fitoquímico, en cuanto al contenido de carotenos resultó positivo

en los extractos metanólicos y acuosos. El radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) tiene un electrón desapareado y es de color azul- violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante (Figura 5).



**Figura 5.** Fotografía de los 12 extractos de flavonoides evaluado a 100 ug/ml, para determinar la capacidad antioxidante.

### 3.6 Actividad antioxidante

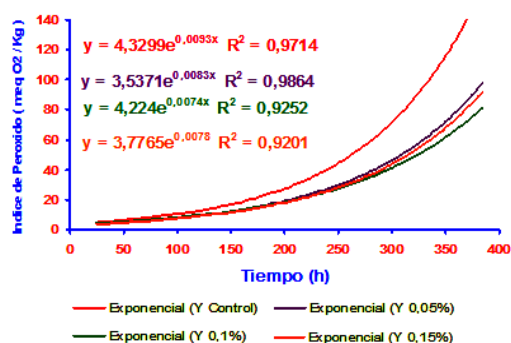
La actividad antioxidante de los extractos acuosos M10, M11 y M12 que presentaron mayor capacidad antioxidante, fue determinada por el incremento del índice de peróxido en el tiempo, siendo comparados a un control al cual no le fue adicionado extracto de flavonoide.

En las figuras 6, 7, y 8 se presentan la variación del índice de peróxido en función del tiempo para el aceite sachá inchi acondicionado con extracto acuoso de flavonoides a concentraciones de 0,05%; 0,1% y 0,15% y el control.

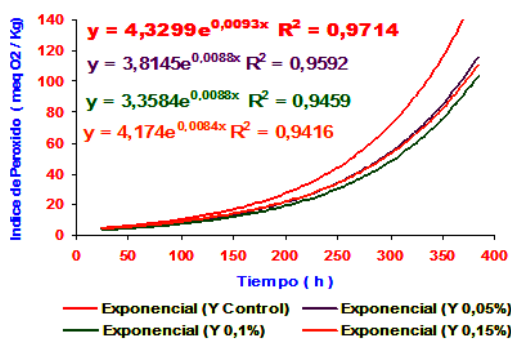
Así, se puede observar en las figuras 6, 7 y 8 a las 384 h, tiempo final del ensayo, la curva que representa al control, sobrepasó marcadamente a los 100 meq O<sub>2</sub>/kg y las curvas acondicionadas con 0,05% y 0,15% llegaron a los 100 meq O<sub>2</sub>/kg, valor máximo establecido para el ensayo, lo cual supone un completo deterioro como aceite para consumo (AOM, Active Oxygen Method; Badúí-Dergal, 2006), mientras que la curva que representa al 0,1% de flavonoides aún no había alcanzado este valor máximo de peróxido. En las figuras también se incluyeron los modelos matemáticos propuestos que describieron el comportamiento de cada una de las curvas. Además, con los datos experimentales el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0, nos da una superficie de respuesta estimada, de ello se puede decir que la región

donde se encontraron los índices de peróxido más bajos corresponden a la concentración 0,1%, lo cual coincide con lo representado en las figuras: 6, 7 y 8, en donde observamos que la curva que representa la concentración 0,1% se alejó más del control, es decir tiene el menor índice de peróxido.

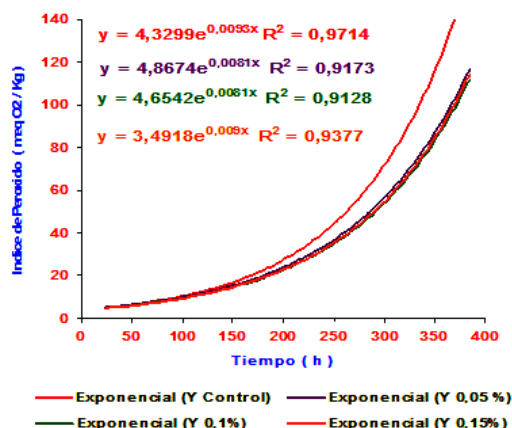
Así mismo este programa estadístico Statgraphics Plus 4.0, nos permitió hacer un análisis de comparaciones múltiples de las pendientes de los modelos matemáticos de las curvas exponenciales obtenidas para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de diferentes concentraciones (0,05%; 0,1% y 0,15%) y el control para cada uno de los extractos M10, M11 y M12. De este análisis de comparaciones múltiples de pendientes podemos decir que la pendiente 3 que corresponde a la concentración 0,1% es la que más se alejó del control, es decir, tiene el menor índice de peróxido a las 384 horas.



**Figura 6.** Efecto del extracto acuoso M10 sobre la estabilidad del aceite Sacha Inchi al 0,05%; 0,1% y 0,15% y el control.



**Figura 7.** Efecto del extracto acuoso M11 sobre la estabilidad del aceite Sacha Inchi al 0,05%; 0,1% y 0,15% y el control.



**Figura 8.** Efecto del extracto acuoso M12 sobre la estabilidad del aceite Sacha Inchi al 0,05%; 0,1% y 0,15% y el control.

Entre las características estructurales que le confieren la actividad antioxidante a los flavonoides, se encuentran: presencia del grupo O-dihidroxi en el anillo B, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; doble enlace, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C; grupos 3' y 5'-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Pérez, 2003).

#### 4. Conclusiones

Los extractos acuosos de flavonoides obtenidos a partir de harina de cascara de naranja tangelo presentaron la mayor capacidad antioxidante, medida por el porcentaje de captación de radicales libres a una concentración del 100 ug/ml, los cuales incorporados al aceite Sacha Inchi, en una concentración del 0,1% presentaron mayor actividad antioxidante a las 384 horas con respecto a una muestra control (sin acondicionamiento con extractos). Lo cual establece que los metabolitos de naturaleza polar extraídos con solventes orgánicos pueden ser utilizados como agentes antioxidantes naturales. Se concluye que las cáscaras de naranja tangelo pueden ser utilizadas como materia prima en la obtención de extractos químicos naturales de naturaleza antioxidante, y que pueden ser utilizados por la industria aceitera, para la substitución de los antioxi-

dantes artificiales, que en alguno de los casos no son beneficiosos para la salud del consumidor. Por otro lado, permitirá aumentar el valor agregado a un desperdicio logrando el aprovechamiento integral de la naranja. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que los flavonoides presentes en la cáscara de naranja tangelo pueden ser utilizados como extractos crudos sin necesidad de purificaciones parciales o totales, para conseguir aumentar la vida útil del aceite sachá inchi.

### Agradecimientos

A CENTROFARMA (Centro de Control Analítico) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, por permitir el uso de sus instalaciones para realizar esta investigación.

### Referencias bibliográficas

- Alañón, M.E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M.C.; Gordon, M.H.; Pérez-Coello, M.S. 2011. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry* 128(4): 997–1002.
- Alejandro-Espinosa, M.; Jaramillo-Fierro, X.; Ojeda-Riascos, S.; Malagón-Avilés, O.; Ramírez-Robles, J. 2013. Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12(1): 59-68.
- Ak, T.; Gülcin, I. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* 174: 27-37.
- Badui-Dergal, S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. Pearson Educación, México: pp. 413.
- Barrón-Yáñez, R.M.; García-Mateos, M. del R.; Soto-Hernández, M.R.; Colinas-León, T.; Kite, G. 2011. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Art.) Yakovlev. *Rev. Fitotec. Mex.* 34 (3): 151 – 157.
- Cartaya, O.; Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales* 22(2): 5-14.
- Castro-Vázquez, L.; Alañón, M.E.; Rodríguez-Robledo, V.; Pérez-Coello, M.S.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Díaz-Maroto, M.C.; Jordán, J.; Galindo, M.F.; Arroyo-Jiménez, M. del M. 2016. Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: ID 8915729, 12 pp.
- Cavia-Saiz, M.; Busto, M.D.; Pilar-Izquierdo, M.C.; Ortega, N.; Pérez-Mateos, M.; Muñiz, P. 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Sci. Food Agric.* 90: 1238-1244.
- Codex Alimentarius, 1981. Norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. Codex Stan 19-1981. Adoptado en 1981. Revisión: 1987 y 1999. Enmienda: 2009, 2013 y 2015.
- Ministerio de Agricultura y Riego. 2014. Estadística mensual. Sistema integrado de estadística agraria. SIEA. Producción agropecuaria, según sub-sectores y principales productos. Periodo: enero-abril: 2000-2014 (miles de t): 16.
- García, D.; Seclen, A.; Rengifo, D.; Saldaña, R.; Dávila, É.; Merino, C.; Sotero, V. 2013. Obtención de lípidos estructurados a partir de mezclas binarias de aceites de castaña (*Bertholletia excelsa*) y sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Rev. Soc. Quím. Perú* 79(4): 359-366.
- Gates, M.A.; Vitonis, A.F.; Tworoger, S.S.; Rosner, B.; Titus-Ernstoff, L.; Hankinson, S.E.; Cramer, D.W. 2009. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case - control study. *Int. J. Cancer* 124: 1918-1925.
- Lapornik, B.; Prosek, M.; Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71: 214-222.
- Li, H.; Wang, X.; Li, P.; Wang, H. 2009. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected china wines. *Food Chem.* 112: 454-460.
- Li, S.; Lo, C.Y.; Ho, C.T. 2006. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(12): 4176- 4185.
- Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia universidad Católica del Perú. Segunda Edición: 123-124.
- Markham, K.R. 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academia Press, London: pp. 113.
- Martínez, A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia: pp. 76.
- Mehlenbacher, V.C. 1979. Análisis de grasas y aceites. URMO. Bilbao, España: pp. 213.
- Meiyanto, E.; Hermawan, A.; Anindyajati. 2012. Natural products for cancer- targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemoprotective agents, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13: 427-436.
- M'hiri, N.; Ioannou, I.; Ghoul, M.; Mihoubi-Boudhrioua, N. 2014. Extraction methods of citrus peel phenolic compounds. *Food. Rev. Int.* 30: 265-290.
- M'hiri, N.; Ioannou, I.; Mihoubi-Boudhrioua N.; Ghoul, M. 2015. Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and bioproducts processing* 96: 161-170.
- Moreno-Álvarez, M.J.; Hernández, J.G.; Rovero, R.; Tablante, A.; Rangel, L. 2000. Alimentación de tilapia con raciones parciales de cáscaras de naranja. *Ciencia y Tecnología Alimentaria (España)* 3: 29-33.
- Moreno-Álvarez, M.J.; Belén-Camacho, D.R.; Sánchez, M.P.; Viloria-Matos, M.; García, D. 2004. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. *Interciencia* 29(9): 532-538.
- Moreno-Álvarez, M.J.; Guarán, C.Y.; Douglas-Rafael, B.C.; García-Pantaleón, D.; Medina-Martínez, C.A. 2007. Efecto de los extractos de flavonoides de harinas de cáscaras y semillas de pomelos sobre la estabilidad de aceite de soja. *Grasas y aceites* 58 (4): 351-358.
- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Domínguez, J.M.; Sineiro, J.; Domínguez, H. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72: 145-171.

- Padilla-Camberos, E.; Lazcano-Díaz, E.; Flores-Fernández, J.M.; Owolabi, M.S.; Allen, K.; Villanueva-Rodríguez, S. 2014. Evaluation of the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes, the antioxidant activity, and the polyphenolic content of citrus limetta peel extract. The Scientific World Journal 2014: ID 121760: 4 pp.
- Pérez, G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o pro-oxidantes. Rev Cub Inv Biom. 22(1): 48-57.
- AOAC. 2005. Norma general del código para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18<sup>o</sup> Edition. Gaithersburg, Maryland – USA.
- Pérez-Nájera, V.C.; Lugo-Cervantes, E.C.; Gutiérrez-Lomelí, M.; del Toro-Sánchez, C.L. 2013. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco. Normalistas 800. Guadalajara, Jalisco, México. Volumen XV. Número 3: 20.
- Rezzadori, K.; Benedetti, S.; Amante, E.R. 2012. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. Food Bioprod. Process. 90: 606-614.
- Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y.S. 2006. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and. Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry 99: 838-841.
- Xi, W.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Shen, Y.; Ye, X.; Zhou, Z. 2014. Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) pulps and their antioxidant properties. Industrial Crops and Products 52: 466-474.
- Yuan-Chuen, W.; Yueh-Chueh, C.; Hsing-Wen, H. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. Food Chemistry 106: 280-281.
- Wan, C.; Shuai-Shuai, H.; Li-Hong, Y.; Jun, C.; Xiao-Qing, P.; Jing-Jing, X. 2015. Trace matrix solid phase dispersion using a molecular sieve as the sorbent for the determination of flavonoids in fruit peels by ultra-performance liquid chromatography. Food Chemistry 190: 474-480.
- Wang, L.; Wang, J.; Lianying, F.; Zheng, Z.; Zhi, D.; Wang, S.; Li, S.; Ho, Ch.; Zhao, H. 2014. Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others, BioMed Research International 2014: ID 453972, 10 pp.